

## BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-533698

(P2002-533698A)

(43) 公表日 平成14年10月8日 (2002.10.8)

(51) IntCl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 9 3	G 0 1 N 33/543	5 9 3 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 5 2
1/34		1/34	B 2 G 0 6 0
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 9
1/68		1/68	A 4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-591214(P2000-591214)  
 (86) (22) 出願日 平成11年12月22日 (1999.12.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年6月20日 (2001.6.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP99/10334  
 (87) 国際公開番号 WO00/39325  
 (87) 国際公開日 平成12年7月6日 (2000.7.6)  
 (31) 優先権主張番号 198 60 547.1  
 (32) 優先日 平成10年12月23日 (1998.12.23)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 インスティトゥート フュア フィジカー  
 リッシェ ホッホテヒノロギー エー. フ  
 ァウ.  
 ドイツ連邦共和国 ディー-07745 イエ  
 ナ ヴィンツァーラー シュトラーセ  
 10  
 (71) 出願人 ヘネトリックス ビー. ヴィ. アイ. オ  
 ー.  
 オランダ国 エヌエル-9713 ジーエック  
 ス フローニンゲン エル. ジェイ. ジ  
 ールストラウエフ 1  
 (74) 代理人 弁理士 斎藤 侑 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー及びその使用

## (57) 【要約】

本発明は分子生物学、たとえば医学的診断、特にバイオセンサー技術またはDNA微小アレイ試験などへの応用を目的とする、特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサーに関する。本発明の目的は、高速・高感度・高特異性であり、取扱が容易で日常的に分子、特に生物活性分子の存在を検出し得る、特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー、およびその特定の使用法を提供することである。この目的のため、本発明によるアフィニティセンサーは一定間隔に配置された少なくとも2つの電極(2)を備えた担体基板(1)から成り、前記電極は領域(4)の両側において領域(4)をカバーし、少なくともこの領域(4)は、対応する相補的結合パートナー(6)と直接に、あるいは他の結合分子(7)を介して結合し得る、固定化された特異的結合パートナー(5)のために使用され、前記領域(4)は、導電性粒子(62)を含む対応する相補的結合パートナー(6)の少なくとも1つを、同粒子(62)と電極(2)がトンネル接触接合を形成する可能性を確保するような最小の幅bを有するように定め

られる。本センサーはバイオモニタリングに使用される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 一定間隔で配置された少なくとも2つの電極(2)を備えた担体基板(1)から成り、同電極は領域(4)の両側において領域(4)をカバーし、少なくともこの領域(4)が、対応する相補的結合パートナー(6)と直接に、あるいは他の結合分子(7)を介して結合し得る、固定化された特異的結合パートナー(5)を受け入れるために使用され、前記領域(4)は、導電性粒子(62)を有する対応する相補的結合パートナー(6)の少なくとも1つを、同粒子(62)と電極(2)がトンネル接触接合を形成する可能性を確保するような最小の幅bを有するように定められる、特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項2】 前記領域(4)が800nm未満の幅bを有することを特徴とする、請求項1に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項3】 固定化された特異的結合パートナー(5)が電極(2)と共にトンネル効果を生じ得る厚さに被覆されることを特徴とする、請求項1に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項4】 電極(2)が2個ずつの対をなす微小電極(21)として形成され、測定・評価装置(3)が付随する増幅回路(8)に接続されることにより、電極(2)に電圧を印加したときの領域(4)における電流を検出し得ることを特徴とする、請求項1に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項5】 電極(2)が増幅回路(8)に接続された構成要素であることを特徴とする、請求項1および4に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項6】 増幅回路(8)がマイクロチップ(9)の構成要素であることを特徴とする、請求項1および5に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項7】 電極(2)が櫛形に相互に入り組んだ構造として形成され、それぞれ向き合った櫛形電極(22)間に少なくともアフィニティ面(41)が

存在することを特徴とする、請求項1に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項8】 櫛形電極(22)とアフィニティ面(41)とが同一のチップ面(42)に配置されることを特徴とする、請求項1および7に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項9】 チップ面(42)がシリコンウェハーにより形成されることを特徴とする、請求項1および8に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項10】 チップ面(42)がガラスターゲットにより形成されることを特徴とする、請求項1および8に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項11】 櫛形電極(22)が幾何学的に対称な指状構造として、多数のアフィニティ面(41)がマトリックスとして配置され、アフィニティ面(41)以外の部分の電極(2)がそれらのインターフェイス(23)において相互にそれらの間にある絶縁層(24)により分離されていることを特徴とする、請求項1および7に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項12】 微小電極(21)の長さが0.1mm、領域(4)の幅bが0.1 $\mu$ m、有効高さが0.02 $\mu$ mであり、アフィニティ面(41)とチップ面(42)との比が1:10であることを特徴とする、請求項1または7に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項13】 アフィニティ面(41)の他に、基準測定のため特異的結合パートナー(5)に代えて不活性な結合パートナー(51)を結合させた、少なくとも1つの参照面(43)を備えることを特徴とする、請求項1または7に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項14】 個々のアフィニティ面(41)にそれぞれ異なる密度で特異的結合パートナー(5)を結合させることを特徴とする、請求項1または7に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項15】 個々のアフィニティ面(41)にそれぞれ異なる特異的結

合パートナー (5) を担持させることを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 16】 異なる不活性結合パートナー (51) をそれぞれ結合させた複数の参照面 (43) を備えることを特徴とする、請求項 1、13、14 または 15 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 17】 特異的結合パートナー (5) として配位化合物を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 18】 特異的結合パートナー (5) として生物活性分子またはバイオミメティック分子を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 19】 特異的結合パートナー (5) が核酸であることを特徴とする、請求項 1 および 17 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 20】 特異的結合パートナー (5) がタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 および 17 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 21】 特異的結合パートナー (5) が糖類であることを特徴とする、請求項 1 および 17 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 22】 大きさが  $0.1 \sim 5 \mu\text{m}$  の導電性粒子 (62) が固定されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 23】 大きさがナノメートル領域の導電性粒子 (62) が固定されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項 24】 導電性粒子 (62) が金属クラスター化合物から成ることを特徴とする、請求項 1 に記載の特異的結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー。

【請求項25】 配位化合物である対応する相補的結合パートナー(6)を検出するためにアフィニティセンサーを用いることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項26】 生物活性分子またはバイオミメティック分子である対応する相補的結合パートナー(6)を検出するためにアフィニティセンサーを用いることを特徴とする、請求項25に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項27】 核酸である対応する相補的結合パートナー(6)を検出するためにアフィニティセンサーを用いることを特徴とする、請求項25に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項28】 タンパク質である対応する相補的結合パートナー(6)を検出するためにアフィニティセンサーを用いることを特徴とする、請求項25に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項29】 糖類である対応する相補的結合パートナー(6)を検出するためにアフィニティセンサーを用いることを特徴とする、請求項25に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項30】 アフィニティセンサーをバイオモニタリングに使用することを特徴とする、請求項1～24のいずれかに記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項31】 アフィニティセンサーを細胞の検出に使用することを特徴とする、請求項30に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項32】 アフィニティセンサーを微生物の検出に使用することを特徴とする、請求項30に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項33】 アフィニティセンサーを遺伝子疾患および細菌性疾患の検出に使用することを特徴とする、請求項30に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項34】 アフィニティセンサーを遺伝子発現の検出に使用することを特徴とする、請求項30に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項35】 アフィニティセンサーを生態学的母集団中の微生物の検出に使用することを特徴とする、請求項32に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

【請求項36】 アフィニティセンサーを医学的診断に使用することを特徴とする、請求項30に記載のアフィニティセンサーの特異的結合の形成の検出のための使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は特に医学的診断、バイオセンサー技術、DNA微小アレイ技術等の分子生物学分野への応用を目的とする、特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー、およびその使用に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

バイオセンサーは少なくとも1つの生物学的レセプター、変換器、およびそれに接続される電子回路から成る固定相測定機器である。

## 【0003】

レセプターにおいては、生物活性を有する反応物、たとえば抗体を用いて特定の物質、たとえば抗原を認識する。認識された事象の検出可能な信号への変換は、電気化学的、光学的、圧電的あるいは熱量測定の方法を利用した変換器によりなされる。認識された事象と変換器との結合は間接的な場合と直接的な場合とがある。前者においては変換器の検出するプロセスが認識された事象により変調され、後者においては事象自体が変換器により記録される。変換器は信号の捕捉および評価を行うための電子装置、たとえばマイクロプロセッサおよびそれに接続されたモジュールと結合している。

## 【0004】

この分子認識に基づくバイオセンサーの用途は多岐にわたり、たとえば生体分子の検出と濃度測定、生化学反応の速度論的および平衡論的解析、発酵プロセスの監視、レセプターと細胞の相互作用のキャラクタリゼーション、臨床分析、細胞の検出などが挙げられる。

## 【0005】

生物活性を有する分子の検出は、核酸の場合にはたとえば特異性を有する標識された核酸プローブとのハイブリッド化によって行われる。プローブの標識は、放射性同位体（トリチウム、硫黄35、リン32など）、非放射性分子（ジゴキシゲニン、ビオチンなど）、非放射性蛍光分子（イソチオシアン酸フルオレッセイ

ン、7-アミノ-4-メチルクマリル-3-酢酸塩など)、金属粒子(金など)でラベルしたヌクレオチドの酵素的組み込みによって行われる(Nicholl、D. S. T.、1995: Genetische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg、p. 24~27)。

#### 【0006】

ペプチドやタンパク質などの抗原の場合の生物活性分子の検出には、特異性を有する標識された抗体が用いられる。抗体の標識は、チロシンまたはヒスチジン残基への放射性同位体(ヨウ素125、トリチウムなど)の結合、非放射性酵素(アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなど)(この場合酵素活性はたとえば無色の物質の有色物質への転換によって測定される)、過酸化水素とルミノールのケミルミネッセンス反応に作用する非放射性酵素(ヘマチンなど)、ルシフェラーゼのように燐化ルシフェリンのバイオルミネッセンスに作用する非放射性酵素、あるいは金などの金属粒子により行われる(Liddell、E.、Weeks、I: 1996: Antikoerper-techniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg、p. 87~107)。

#### 【0007】

使用される種々の標識分子の信号は放射化学的、電気化学的、光学的、圧電的あるいは熱量測定装置により測定され、認識された分子的事象を表現する。個々の信号を発信する標識分子の大きさはナノメートルレベルである。

#### 【0008】

分子結合の形成の測定のために現在最も普通に利用されている方法は光学的方法および電気化学的方法である。

#### 【0009】

各種の光学的方法には、個々の標識分子から生ずる信号の感度や空間的分解能が多く用途のためには不十分であること、特異的分子結合対における2つの部分の結合が検知できないこと、しばしば非特異的なバックグラウンドが信号に重畳することなどの問題がある。画像表示装置の場合、信号の増幅あるいはコンピ



ュータによる統計的画像解析によりこれらの問題点を解決することは部分的にし  
か可能でない。

#### 【0010】

現在のチップ技術による自動画像解析の技術的限界は種々のマイクロアレイス  
ポットの選択にある。現在利用できる技術の大部分はチップ表面に特異的に保持  
されている蛍光標識した結合対の検出に基づくもので、マイクロアレイの反応中  
心を光学的に選択することにより蛍光を検出する。この場合、前記の古典的方法  
と同じく、蛍光またはケミルミネセンスを発する試料はCCDイメージング技術  
と組み合わせて使用される (Eggers, M. et al., 1996: P  
rofessional Program Proceedings, Elec  
tro '96, IEEE, New York, NY, USA, 364 pp. ;  
Heller, M. J., 1996: IEEE Engineering in  
Medicine and Biology Magazine 15:10  
0~104)。この場合にも古典的画像解析の場合と同様な前記の問題が存在し  
、特異的分子結合対における2つの部分の結合を検出することはできない。

#### 【0011】

生物活性分子の存在の検出には、頻繁に用いられる光学的方法と並んで、電気  
化学的方法も種々の形で行われている。

#### 【0012】

生体分子が酵素などに特異的に結合する際に生ずる酸化還元電位の変化を測定  
する方法が知られている。酸化還元電位の変化は生体分子を有する電極と参照電  
極とを用いて測定する (Heller, A., 1992: Elecric al  
connection of enzyme redox centers t  
o electrodes, J. Phys. Chem. 96:3579~358  
7)。

#### 【0013】

この方法の欠点は、生体分子の結合の形成においては個別的な電子的事象が生  
ずるのみであるため、これに起因する酸化還元電位の変化は短時間しか持続せず  
、したがって個々の結合形成の検出を瞬間的に行わなければならないことである

。これは実際には不可能であり、得られる信号は累積的なものにすぎず、したがって頻度の低い事象はこの方法では検出することができない。

#### 【0014】

電気的な方法で生物活性分子の存在を検出する別の可能性として、特異性を有する測定用電極を用いる方法がある。この電極は一般に（ストレプト）アビジンを被覆したもので、（ストレプト）アビジンはビオチン分子と特異的に結合する性質を有する。これによりビオチンで標識したペプチド、オリゴヌクレオチド、少糖類および多糖類、脂質などを検出し、あるいは（ストレプト）アビジン層にリガンドとして結合させることが可能である。この場合ビオチン分子が結合要素となる。一般にこのバイオセンサーによれば、抗体／抗原、抗体／ハプテン、糖類／レクチン、タンパク質／核酸、核酸／核酸などの結合対を検出することができる。特異性のある測定電極において起こる生化学的事象は前記の酸化還元系に基づく方法と同じく、参照電極に対する個別電極の電位変化を測定することによって検出する（Davis et al.、1995: Elements of biosensor construction. Enzyme Microb. Technol. 17:130~1035）。

#### 【0015】

このような従来のバイオセンサー技術の本質的な欠陥は、測定電極を介して行われる測定之感度が低く、デキストラン層を使用するなどの方法によっても、電極上のリガンドの密度を無限に大きくすることが不可能である以上、この欠点を除くことはできない。デキストラン層などを塗布することにより、リガンドを立体的に配列させれば、リガンド単分子層に比べて密度を最大6倍程度に増加させることは可能であるが、頻度の低い結合の形成、まして1つの特異的分子結合対における2つの部分の結合を検出することは不可能である。

#### 【0016】

以上のほかに公知の可能性としては、電界効果トランジスタの半導体ゲート上に特定の抗体を固定し、特定の抗体層への抗原の選択的結合により電荷分布の変化、したがって電界効果トランジスタの状態の変化を生じさせる方法、特定の抗体を光ファイバー表面に固定化し、光ファイバーと液体の界面において特定の抗

体層に抗原が選択的に結合することにより測定可能な光学現象、たとえば干渉波や表面プラズモンを発生させる方法、一定の入射角の光に対して、ある媒体と、金属を被覆し特定の抗体を固定したガラスとの屈折率が抗原の選択的結合により変化するのを測定する方法などがある (Liddell, E.、Weeks, I : 1996 : Antikoerpertechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, p. 156 ~ 158)。

【0017】

これらの方法の欠点は、頻度の低い結合の形成が検出できないことである。

【0018】

バイオセンサーにおける結合対形成の生化学的プロセス、たとえば2本のヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーションや抗体と抗原との結合などは、それ自体としては極めて高速であり、数秒程度で起こる。バイオチップに結合分子、たとえば特定のオリゴヌクレオチド (米国特許第5, 445, 934号) や特定のタンパク質 (米国特許第5, 077, 210号) を付着させることにより、数分程度で特定の生体分子の存在を検出するようなチップ技術は可能である (Osborne, J. C.、1994 : Genosensors. Conference Record of WESCON/94. Idea/Microelectronics. IEEE, New York, NY, USA : 434 pp. ; Eggers, M. D. et al.、1993 : Genosensors, microfabricated devices for automated DNA sequence analysis. Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 1998)。たとえば特定のオリゴヌクレオチドプローブにより遺伝子を、特定の抗体により抗原を検出することができる。この方法は生物学・医学、特に遺伝子研究において大きな可能性を有する (Chee, M. et al.、1996 : Accessing genetic information with high-density DNA arrays. Science 274 : 610 ~ 614)。しかし現状では低濃度の分子間の結合、ましてや個々の分子対の結合を高速で測定し得る方法はほとんど存在

しない (Lemieux, B., et al., 1998: Overview of DNA chip technology. Molecular Breeding 4: 277~289)。

【0019】

核酸結合対間の結合の形成を検出する有望な方法として、DNAのハイブリダイゼーション前後の誘電緩和周波数を利用する方法がある (Beattie et al., 1993. Clin. Chem. 39: 719~722)。しかしこの周波数差の検出には極めて高価な設備が必要であり、また日常的に利用できる段階ではない。

【0020】

ハイブリダイゼーション前後の試料を電子的に識別する方法としては更に、DNA鎖に沿った電子の移動速度を測定する方法がある (米国特許第5, 780, 234号)。この測定法は、DNA二重鎖の $\pi$ 電子軌道の配置から、二重鎖、すなわちハイブリダイゼーション後のDNAにおける電子移動速度が一本鎖DNAにおけるよりも速いことを利用するものである (Lipkin et al., 1995: Identifying DNA by the speed of electrons. Science News 147: 117 pp.)。この電子移動を測定するためには、目的試料は正確に2つの分子の間に位置するように、その分子の一方は電子供与体として、他方は電子受容体として働くようにそれぞれ化学的に修飾して、電極を通じての電子の流れを測定できるようにする必要がある。

【0021】

この方法は複雑であり、かつ対象が一定の長さの一本鎖核酸フラグメントに限られ、他の生体分子には適用できない欠点を有する。

【0022】

また、粒子の電子的検出法が知られている (Bezryadin, A., Dekker, C., Schmid, G., 1997: Electrostatic trapping of single conducting nanoparticles between nanoelectrodes. Appl

ied Physics Letters 71:1273~1275)。この方法では試料流中の電極に電圧を印加し、電極ギャップ間にナノ粒子を捕捉することにより検出を行う。この場合は生体分子の結合の形成と異なり、ナノ粒子の結合は生化学的特異性によるものではなく、電場によって電極ギャップに捕捉される。

#### 【0023】

さらに、2つの微小構造を有する電極の間でDNA分子を伸長させることができ、この分子に銀被覆を施すことで導電性を持たせることができることが示されているが(Braun、E.、Eichen、Y.、Sivan、U.、Ben-Yoseph、G.、1998:DNA templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. Nature 391:775~778)、このことは特定の生体分子の結合の形成とは関係がない。

#### 【0024】

短い一本鎖DNA分子とそれに対する相補的なDNA分子に金粒子による標識を施したものの複合体を溶液中で生成させ、炭素膜上のTEMグリッド上で電子顕微鏡観察を行っている(Alivisatos、A. P.、Johnsson、K. P.、Peng、X.、Wilson、T. E.、Loweth、C. J.、Bruchez Jr.、M. P.、Schulz、P. G.、1996:Organization of nanocrystal molecules using DNA. Nature 382:609~611)が、分子対生成の電気的特徴付けは行われていない。

#### 【0025】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、高速・高感度・高特異性であり、取扱い容易で日常的に分子、特に生物活性分子の存在を検出し得る、特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサー、およびそのようなアフィニティセンサーの特定の使用の可能性を提供することにある。

#### 【0026】

## 【課題を解決するための手段】

この目的は、特許請求項に示した諸特徴により達成される。そのようなセンサーは特に、距離を置いて配置された電極を備える担体基板を有し、同電極は特異的結合パートナーが固定化された領域の両側において領域をカバーし、この結合パートナーに導電性粒子を有する対応する結合パートナーが特異的に結合することにより、同粒子による導電性接触が電極間に確立され、これにより電極に印加された電圧の変化の測定を通じて、単一または複数の、導電性粒子を有する対応する相補的結合パートナーの存在を検出することができる。

## 【0027】

## 【発明の実施の形態】

以下、数種の実施例およびそれらの図面を用いて本発明をさらに詳細に説明する。

図1および図2に示した、特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサーは、固定化された結合パートナー5を有する領域4の両側において領域4をカバーする電極2を備えた担体基板1から成る。領域4は増幅回路8（マイクロチップ9の一部であってもよい）を表し、測定および評価装置を含む電気回路における不連続点をなしており、領域4を区画する電極2はこの例では電気回路に属するとともに領域4の最小幅bを定めている。特異的結合パートナー5は、導電性粒子62を有する対応する相補的な結合パートナー6と直接に、あるいは仲介分子7を介して特異的に結合可能であり、これによって導電性粒子62を有する相補的な結合パートナー6と直接あるいは結合分子を介して結合する。領域4には電極2の配置により、固定化された特異的結合パートナー5と、導電性粒子62を有する対応する相補的な結合パートナー6との結合、あるいは他の特定の仲介分子7と導電性粒子62を有する対応する相補的な結合パートナー6との結合が可能であるような幅と有効高さが付与されている。特異的結合パートナー5が核酸プローブ種として実現される場合、導電性粒子62を有する対応する相補的な結合パートナー6は核酸であり、粒子62は大きさ20nm程度のナノ粒子であり、領域4の最小幅bは25nm、有効高さは20nmである。

## 【0028】

領域4における特異的結合パートナー5と、導電性粒子62を有する対応する相補的な結合パートナー6との結合は、電極2に電圧が印加されているとき（図1参照）には電子移動障壁を超えて電子を移動させ、導電性粒子62は領域4に架橋し、電子が粒子62から粒子62へ、さらに電極2へとトンネル効果により移動することにより、領域4を挟む電極2間の電気抵抗の恒常的な変化が増幅回路8およびそれに接続された測定・評価装置3により測定される。

#### 【0029】

測定は乾燥環境においてのみならず、湿潤環境においても、特にゲル層を用いて実施することができる。

#### 【0030】

導電性粒子62の結合した対応する相補的結合パートナー6による電極2間の領域4の電気伝導率を向上させるために、水溶性フェロセン／フェリシニウム、ヒドロキノン／キノン、有機塩の酸化・還元可能な成分、コバルタセン、モリブデン・タングステン・鉄のヘキサおよびオクタシアニド、コバルト・ルテニウム・ニッケル等の遷移金属の大環状化合物またはキレートリガンド（たとえばCo（エチレンジアミン）<sub>3</sub>、Ru（エチレンジアミン）<sub>3</sub>、Co、Ru、Fe等の遷移金属のトリスビピリジルまたはヘキサアンミン錯体など）、あるいは4，4'-ビピリジン、4-メルカプトピリジン等の有機分子等の従来の電子移動メディエータまたは有効な拡散性電子供与体または受容体を、溶液中の遊離状態あるいは担体基板1上に塗布したゲル、または担体基板1上に塗布したポリマーの形で使用することができる。特異的結合パートナー5として核酸を用いる場合、従来のゲルによるマトリックス固定化法が、ポリマーの三次元的構造のため領域4の小面積上に多数の捕捉リガンドを固定化できる点で特に好ましい。多孔性ヒドロゲルを使用すれば、たとえば核酸のハイブリダイゼーション（特異的結合パートナー5と導電性粒子62を有する対応する相補的結合パートナー6とに相当する）の速度が向上し、溶液中の核酸について知られている値と同程度に達する。

#### 【0031】

図3および図4に示すアフィニティチップとして形成されたアフィニティセンサーは、電極2が対をなして配置され、アフィニティ面41をカバーする微小電

極21を形成することにより、多数の中間空間4において異なる多数の結合を同時に電氣的に検出し得るアフィニティ空間41のマトリックスを形成することを特徴とする。

#### 【0032】

個々のアフィニティ空間41は、たとえば誘電性酸化物層を有するシリコンまたはガラスから成るチップ表面42上に指状の電極構造として形成される。指状に分岐した微小電極21は図5に示すように、インターフェイス23において中間の絶縁層24により空間的にも電氣的にも分離されており、櫛形電極22として形成することも可能である。これによりアフィニティ面41上に長さ20 $\mu$ m程度の領域4が確定される。特異的結合パートナー5が核酸プローブ種として実現され、導電性粒子62を有する対応する相補的結合パートナー6は核酸であり、粒子62は大きさ20nm程度のナノ粒子である場合には、領域4は有効高さ100nm、幅200nm程度であり、これによって固定化された特異的結合パートナー5（この例では捕捉リガンドとしての核酸プローブ）と、導電性粒子62を有する対応する相補的結合パートナー6（この例ではターゲット分子としての核酸）との、電極21間の結合を引き起こす結合が少なくとも1つ生ずることができる。この場合、特異的結合パートナー5として固定化されたオリゴヌクレオチドプローブはアミノ基を介してシラン被覆された担体基板1に結合し、このとき達成されるプローブ密度は分子10000個/ $\mu$ m<sup>2</sup>程度である。対応する相補的結合パートナー6はこの例では金粒子で標識されたオリゴヌクレオチドであり、ハイブリダイゼーション条件は使用するプローブにより異なる。

#### 【0033】

アフィニティ面41はまた、各々分離された部分に別々の特異的結合パートナー5を固定化することも可能である。

#### 【0034】

図3、図4に示したアフィニティチップ上には、固定化された特異的結合パートナー5の結合したアフィニティ面41と、固定化された不活性な結合パートナー51の結合した参照面43が設けられており、微小電極21（櫛形電極22として形成してもよい）間の電気抵抗やアフィニティ面41の電気抵抗を参照面4



3との比較において測定することができる。この場合、固定化された特異的結合パートナー5と固定化された不活性な結合パートナー51は電極21をトンネル効果が起こり得る厚さで覆うことができ、これにより技術的により単純なチップの作成が可能となる。

#### 【0035】

参照面43は不活性な結合パートナー51によって占められ、固定化された特異的結合パートナー5が存在しないので、2つの絶縁された微小電極21の間のこの空間は、測定可能な電子移動を起こさないための障壁として働く。

#### 【0036】

これに対して、固定化された特異的結合パートナー5が結合しているアフィニティ面41は、同パートナーを通じて結合の形成により導電性粒子62を有する対応する相補的結合パートナー6と結合して、アフィニティ面41上の微小電極21（櫛形電極22として形成してもよい）間の空間が導電性粒子62により多数のナノメートル程度の幅を有するギャップに分割されることとなる。このようにして導電性粒子62により形成されたナノギャップによって微小電極21の2つの接触面の間にトンネル効果による電気伝導が可能となり、したがって微小電極21に電圧を印加して電気抵抗の変化を増幅回路8を介して測定・評価装置3により測定することが可能となる。印加電圧はこの例ではおよそ1V未満のである。

#### 【0037】

あるいは、参照電極・試料電極および対電極から成る電極系によりアフィニティ面41に印加される電圧を他の電氣的検出方法、たとえばポテンショメトリーまたはボルタンメトリーにより測定することも可能である。

#### 【0038】

特異的結合パートナー5ないし不活性結合パートナー51、たとえば抗体またはヌクレオチドプローブの固定化には、アミノ修飾リガンドのような標準的な化学リンカーを用いて、シラン被覆されたチップ面42に結合させることによりアフィニティ面41ないし参照面43を形成することができる。

#### 【0039】

対応する相補的結合パートナー 6、たとえばターゲットタンパク質あるいはターゲット核酸を導電性粒子 62 で標識するには公知の方法、たとえばリガーゼを用いた標識オリゴヌクレオチドによる末端標識の方法を利用することができる。

#### 【0040】

以下では本発明によるアフィニティセンサーの製造法をさらに詳細に説明する。好ましい実施例の一つにおいては、アフィニティセンサーは各々少なくとも 2 つの電極 2 を有する複数個の領域 4 (検出領域とも呼ぶ) を備える。これら検出領域は特異的結合パートナー (キャプチャー分子) 5、たとえば抗体、抗体フラグメント、あるいは DNA、RNA または PNA オリゴヌクレオチドを有し、それに対応する特異的結合パートナー (ターゲット分子) 6 が特異的に結合する。結合パートナー 5 はアフィニティセンサーの領域 4 上で所望のターゲット分子と結合のために選択し得る、標識された、または標識されない分子として定義される。ここでキャプチャー分子あるいはターゲット分子として用い得るのは通常の (生体) 分子に限られず、たとえばコンビナトリアル・ケミストリーにおいて知られているような特異的な化学結合対の中でも、本発明の範囲において使用し得るものがある。これら特異的結合の形成は一次的結合の形成として理解することができる。この一次的結合の検出は一段階でも、また最後の段階が金粒子 62 などの電子移動物質の特異的な共固定化であるような多段階のプロセスとしても可能である。この共固定化はたとえば金で標識されたプローブと所望のターゲット分子とのハイブリダイゼーション、あるいは電子的に検出可能な形でのターゲット分子の直接標識のように、特異的あるいは非特異的な分子相互作用により生ずる。共固定化は原理的には一次的結合の形成とは別であるがこれに依存しており、同時に起こることもある。このように共固定化すなわち電子移動物質がアフィニティセンサー上のそのための表面に沈積することは、一次的結合の間接的結果として生じ得る。この共固定化の検出は測定領域の電気伝導度の変化として電子的に行われ、この電気抵抗変化がターゲット分子の存在を示す。電子移動物質の一次的結合は電子を移動させる二次的沈積を誘導するために用いることができる。本発明の範囲内において、ターゲット分子の特異的結合を、電子移動物質が沈積する段階を少なくとも 1 つ含む多段階プロセスにより検出することができ、こ

の段階によって測定領域の電気抵抗が減少する。粒子62に使用される電子伝導性物質としては有機・無機物質ないし化合物を使用することができる。この伝導性は所望のターゲット分子の検出と標識、すなわちその存在の検出に用いられる。

#### 【0041】

以下では本発明によるアフィニティセンサーの製作の諸段階における種々の可能性を説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0042】

A 必要な電極を作成するため、片面に厚さ約1  $\mu\text{m}$ の酸化膜を施したシリコンウェハの酸化面に接着層、たとえば3 nmのTi層と厚さ50～100 nmの金層をスパッタリングにより形成する。微小構造の作成には、電極のギャップ幅をナノメートル領域未満とするため多層マスキングを用い、まず炭素膜(30 nm)、ついで金属複合膜(TiまたはNiCr、10 nm厚)を作成した後、電子ビームレジスト(150 nm)を照射する。露光はミックスマッチ法により、大面積の電極2を電子ビーム照射により、電極2の間の狭いギャップを点照射式の電子ビーム照射装置により形成する。構造の転写は金属層にはイオンビームエッチング(IBE)法、炭素層には反応性イオンエッチング(RIE)法によって行う。金および接着層への構造の転写はIBE法による。ついでO<sub>2</sub>-RIE法でマスキング層を除去し、同時に表面を活性化する。

#### 【0043】

以下に述べる方法はチップ表面のシラン被覆に基づくもので、シラン被覆により表面はアミノ修飾オリゴヌクレオチドとの結合に対して活性化される。ここではシラン被覆とそれに続く固定化の2つの方法について述べる。しかし表面の活性化と固定化はシラン被覆以外の方法によっても可能である。

#### 【0044】

B1 3-アミノプロピルトリメトキシシラン(APTES)によるシラン被覆

#### 【0045】

Aで例示したように、予め金電極の構造を作成したチップを超音波浴中で濃硝酸、過酸化水素(30%)および水で洗浄し、ついで80℃で5分間乾燥し、さ

らにシランの95%アセトン・水混合物中1%溶液中で2分間保持する。チップをアセトンで5分間ずつ10回洗浄した後、110℃で乾燥する。続いてチップをフェニレンジイソシアナートの10%ピリジン/ジメチルホルムアミド中0.2%溶液中で2時間保持し、メタノールとアセトンで洗浄する。このようにして活性化されたチップは4℃のデシケーター中に長期間保存することができる。

#### 【0046】

次にアミノ修飾オリゴヌクレオチドを結合させる。このためにはオリゴヌクレオチド溶液(100mM炭酸カルシウム/重炭酸カルシウム緩衝溶液中2mM)をチップに塗布する。この場合、異なるオリゴヌクレオチドの小滴を並行的に加えれば、たとえば図4に示すアフィニティセンサー実施態様におけるように並列化が可能である。前記小滴の添加には、マイクロピペット、スポッターなど少量の試料を塗布するための既存の方法が利用できる。ついでチップを加湿条件下、37℃で1~2時間保持し、液滴を除いた後アンモニア1%溶液で1回、水で3回洗浄して室温で乾燥する。

#### 【0047】

B2 シラン被覆の第2の可能性は3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン(GOPS)を用いる方法である。前記B1と同様にチップを洗浄し、超音波浴中でヘキサン、アセトン、エタノールで各12分間処理し、80℃で5分間乾燥する。シラン被覆はGOPSの無水トルエン中1mM溶液を用いて80℃で6~8時間行う。チップは酢酸エチルで十分洗浄した後、直接使用する。

#### 【0048】

続いてアミノ修飾オリゴヌクレオチドを結合させる。このためにはオリゴヌクレオチド溶液(0.1M KOH中5~50 $\mu$ M)をチップに塗布し、加湿条件下37℃で6時間保持する。異なるオリゴヌクレオチドの滴を複数個用いることによりB1で述べたのと同様に並列化が可能である。液滴を乾燥除去した後に50℃で振動させつつ洗浄し、室温で乾燥する。

#### 【0049】

C この項ではプローブとしてのオリゴヌクレオチドを金コロイドで標識する可能性について述べる。まずチオール化したオリゴヌクレオチドの前処理を次のよ

うに行う必要がある。3'-アルキルチオールで修飾されたオリゴヌクレオチドは、官能基を保護するため製造者によってジチオール化合物により固体化されており、キャリア物質を分解すると官能基が解放されて活性状態となる。分離はDTT（ジチオスレイトール）の濃アンモニア水50mM溶液中で55℃で16時間行う（開始時：固相固定化オリゴヌクレオチド4～8mg、水450 $\mu$ l、1M DTT 50 $\mu$ l cc、濃アンモニア水50 $\mu$ l）。保持後液相を固相からCPGで分離し、カラムクロマトグラフィーで脱塩する。オリゴヌクレオチドを反応バッファーで溶離する。クロマトグラフィーによる各フラクションの濃度は分光学的測定により求める。

#### 【0050】

反応混合物をサーモミキサーで600rpm、55℃で16時間保持した後、加速度約16000m/s<sup>2</sup>で2～3分間遠心分離する。このようにして得られたフラクションは-20℃で4週間より長期に保存可能である。

#### 【0051】

チオール化したオリゴヌクレオチドと金コロイドとの結合は、たとえば次のようにして行う。

#### 【0052】

金溶液（約17nM）5mlに2.5OD（260nm）のアルキルチオールオリゴヌクレオチドを添加する[OD（260nm）は260nmにおける光学的密度を意味する]（最終濃度3.6nM）。室温で16時間予備的に保持した後、0.1M NaCl/10mM磷酸ナトリウム緩衝溶液（pH7.0）で調節し、室温で40時間保持する。加速度約16000m/s<sup>2</sup>で25分間遠心分離して得られたペレットを0.1M NaCl/10mM磷酸ナトリウム緩衝溶液（5ml、pH7.0）で洗浄した後、再び加速度約16000m/s<sup>2</sup>で25分間遠心分離し、0.3M NaCl/10mM磷酸ナトリウム緩衝溶液（5ml、pH7.0）中に再分散させる。

#### 【0053】

このようにして得られた金コロイド（たとえば径30nm）を含む水溶液約40 $\mu$ lを電極2間の領域4に塗布する。乾燥後前述の電気測定を行うと電圧と電流

の直線関係が見られ、測定領域に凝集した金コロイドのオーミックな挙動が示される。電極2に約0.3Vの電圧を印加したとき電流は0.3 $\mu$ Aである。

#### 【0054】

図3、図4に示したアフィニティチップの形をとるアフィニティセンサーには多様な用途が考えられ、たとえば分子生物学や医学的診断において、生物活性分子とその対応する結合パートナー、たとえばDNA、タンパク質、糖類等との結合を検出するために使用することができる。

#### 【0055】

##### 【発明の効果】

本アフィニティセンサーによれば、電氣的測定によって特異的分子結合の形成を迅速・鋭敏かつ特定の検出ことができ、臨床的プローブや水処理施設における栄養または環境プローブなど種々異なるプローブにおける分子・ウイルス・細菌・細胞などのバイオモニタリングを実施することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサーを示す。

##### 【図2】

図2は特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサーの模式図を示す。

##### 【図3】

図3は特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサーの一実施例の断面図を示す。

##### 【図4】

図4はアフィニティチップの形状をとる、特異的分子結合の形成を検出するためのアフィニティセンサーの一実施例の上面図を示す。

##### 【図5】

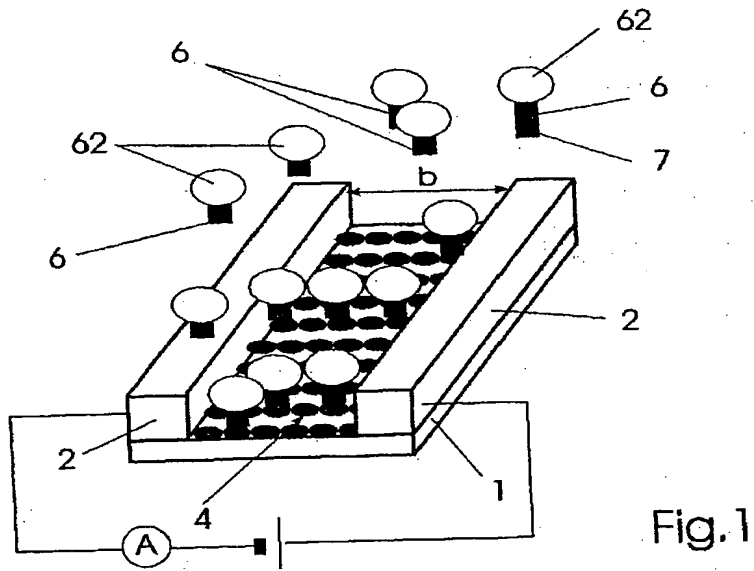
図5は図4のアフィニティチップの平面A-Aにおける断面を示す。

##### 【符号の説明】

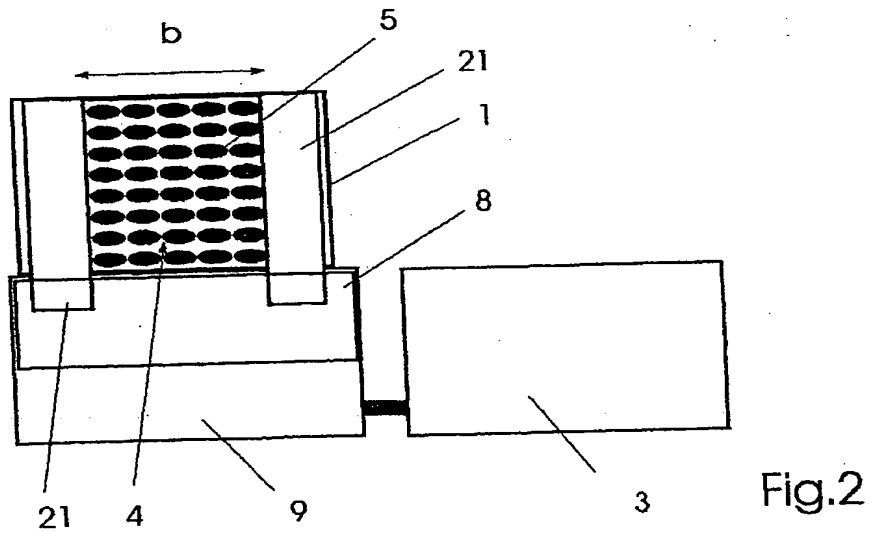
1 担体基板

- 2 電極
  - 2 1 微小電極
  - 2 2 櫛形電極
  - 2 3 インターフェイス
  - 2 4 絶縁層
- 3 測定・評価装置
- 4 領域
  - 4 1 アフィニティ面
  - 4 2 チップ面
  - 4 3 参照面
- 5 特異的結合パートナー
  - 5 1 不活性な結合パートナー
  - 6 対応する相補的結合パートナー
    - 6 2 導電性粒子
- 7 特異的結合分子
- 8 増幅回路
- 9 マイクロチップ
- A 断面
  - b 領域4の幅

【図1】



【図2】





【図3】

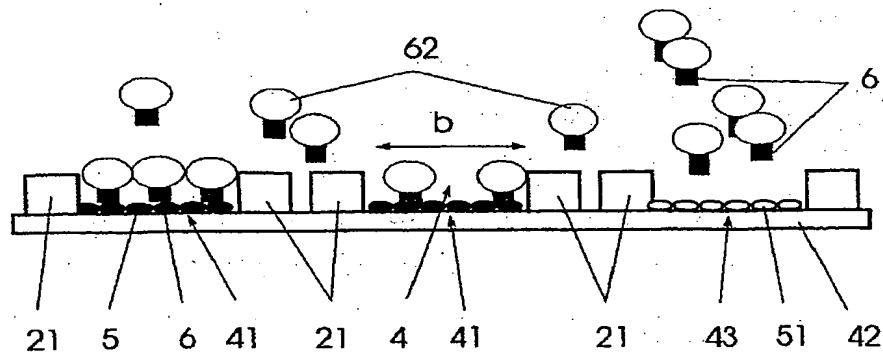


Fig.3

【図4】

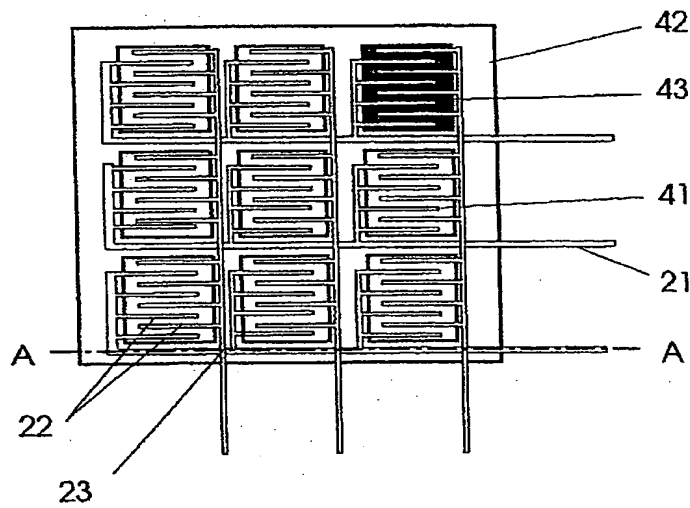


Fig.4

【図5】

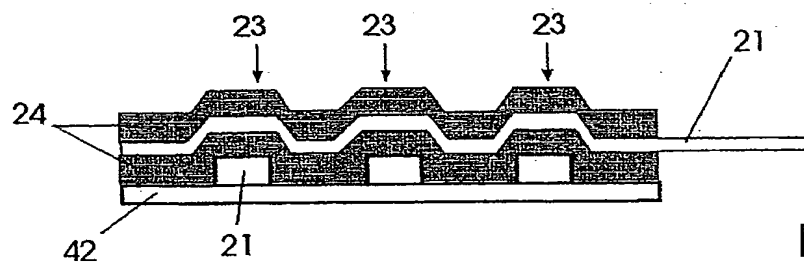


Fig.5

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/10334

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7: C12Q1/00 G01N27/00 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/543 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7: C12Q G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 88 08528 A (BIOTRONIC SYSTEMS CORP), 03 November 1988 (03.11.1988), Abstract	1-24
A	DE 195 17 789 A (INST CHEMO UND BIOSENSORIK MUE), 21 November 1996 (21.11.1996), The whole document	25-36
A	US 5 457 396 A (MORI AKIRA ET AL), 10 October 1995 (10.10.1995), Claims 1, 8, 9	1, 4, 5, 7, 11
A	US 5 494 831 A (KINDLER ANDREW) 27 February 1996 (27.02.1996) Claim 1	1-21
A	WO 97 41425 A (PENCE INC; UNIV MCGILL (CA)), 06 November 1997 (06.11.97) Claims 1, 8	1-6, 9-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 April 2000 (10.04.00)		Date of mailing of the international search report 26 June 2000 (26.06.00)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office		Authorized officer Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/E.P. 99/10334

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8808528 A	03-11-1988	US 5114674 A EP 0358706 A	19-05-1992 21-03-1990
DE 19517789 A	21-11-1996	NONE	
US 5457396 A	10-10-1995	JP 4297864 A AU 1444892 A WO 9217772 A	21-10-1992 02-11-1992 15-10-1992
US 5494831 A	27-02-1996	DE 69421476 D DE 69421476 T EP 0640832 A JP 7151726 A	09-12-1999 04-05-2000 01-03-1995 16-06-1995
WO 9741425 A	06-11-1997	AU 711956 B AU 2563897 A AU 711861 B AU 2563997 A CA 2251674 A CA 2252474 A WO 9741424 A EP 0895592 A US 5955379 A	28-10-1999 19-11-1997 21-10-1999 19-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 10-02-1999 21-09-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N	1/28	G 0 1 N	27/02 D
	27/02		27/04 Z
	27/04		33/483 E
	33/483		33/566
	33/566		37/00 1 0 2
	37/00		1/28 J

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C U, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, L R, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, T R, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, Z A, ZW

- (71)出願人 フリッチェ, ヴォルフガング  
ドイツ連邦共和国 ディー-07743 イエ  
ナ フーフェラントヴェーク 16
- (72)発明者 フリッチェ, ヴォルフガング  
ドイツ連邦共和国 ディー-07743 イエ  
ナ フーフェラントヴェーク 16
- (72)発明者 ツァーキ, アンドレア  
ドイツ連邦共和国 ディー-07774 カン  
ブルク ゲオルクシュトラッセ 9
- (72)発明者 ケーラー, ヨハン, ミヒャエル  
ドイツ連邦共和国 ディー-07751 ゴル  
ムスドルフ ウンターガッセ 8
- (72)発明者 オースティン, ルイ  
オランダ国 エヌエル-9722 アールビー  
フローニンゲン ヘルパー エスウェー  
フ 23
- (72)発明者 スフト, フレデリック  
オランダ国 エヌエル-9728 ヴィエム  
フローニンゲン ジェイ, エイチ, ディ  
ーマー ストラート 25
- (72)発明者 タン, バリス, ソム, チワン  
オランダ国 エヌエル-9751 エスジェイ  
ハーレン エンダボルフ ナンバー 14

(72)発明者 ヴィーガント, アンチェ  
ドイツ連邦共和国 ディー-07743 イエ  
ナ テオーノイバウアー シュトラーセ

10

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 CB21 DA12 DA13  
DA14 DA36 FA34 FB02 FB03  
FB07 FB15 GC06 GC20 JA20  
2G052 AA28 AB16 AD29 AD46 AD57  
DA08 DA22 GA23 GA30 HA02  
JA07 JA09  
2G060 AA10 AD06 AE40 AF02 AF07  
AG10 EB04 GA01 HA01 HE01  
4B029 AA07 AA23 BB01 FA03  
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ01 QQ42  
QQ52 QR55 QR82 QS34 QX04

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**